



**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Diversidade genética e estrutura populacional do nemátode  
parasita *Dirofilaria immitis* em Portugal através do estudo de  
microsatélites

**Mariquinhas António Domingos**

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE  
MESTRE EM PARASITOLOGIA MÉDICA**

**(Novembro, 2017)**



**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Diversidade genética e estrutura populacional do  
nemátode parasita *Dirofilaria immitis* em Portugal  
através do estudo de microssatélites

**Autora:** Mariquinhas António Domingos

**Orientadora:** Professora Doutora Isabel Maurício

**Co-orientadora:** Professora Doutora Silvana Belo

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à  
obtenção do grau de Mestre em Parasitologia Médica.

## **Agradecimentos**

Os meus sinceros agradecimentos

À **Professora Doutora Isabel Maurício** pela sua competência científica e profissional, e, em ter aceitado em orientar-me.

À **Professora Doutora Silvana Belo**, minha co-orientadora, e ao **Doutor Pedro Ferreira** pelo contributo na elaboração do trabalho.

À **Professora Doutora Teresa Novo** e a colega **Madalena Miguel Eduardo** pela consideração inigualável.

A **todos os professores**, funcionários do IHMT, em particular aos de **Informática** e aos colegas que direta e indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

À **minha família** por aceitarem as minhas ausências constantes.

## Resumo

A dirofilariose é uma doença causada pelo nemátode parasita *Dirofilaria immitis*, transmitido por mosquitos culicídeos (*Aedes*, *Anopheles* e *Culex*). O hospedeiro definitivo são canídeos e felídeos, e o ser humano é afetado acidentalmente.

Este estudo teve como objetivos: Montar, no laboratório, um painel de 11 microssatélites A2, A5, B5, H5, H4, E4, D2, A4, C2, H5, G9 e A05 descritos para *D. immitis*, avaliar a aplicação em parasitas adultos e microfilárias no sangue, determinar a sua diversidade por regiões em Portugal, comparar com outros marcadores previamente usados (espaçador interno transcrito 2 ribossomal - ITS2).

Foram estudados um total de 23 amostras, 11 amostras de vermes adultos, machos e fêmeas provenientes de um cão, e 12 amostras de sangue de cão confirmadas com microfilárias de *D. immitis*.

A região do ITS2 de vermes adultos foi amplificada por PCR, sequenciada e comparada com sequências obtidas de amostras de sangue e de vetor de Portugal e outras regiões. Amplificou-se por PCR onze marcadores de microssatélites. Os produtos de PCR de microssatélites foram detetados em gel de agarose e separados para genotipagem em eletroforese em gel de poliacrilamida.

Detetaram-se polimorfismo em oito dos nove microssatélites estudados. Foram encontrados nove perfis alélicos para nove loci e doze perfis alélicos parciais (seis loci) para todas as amostras. Cada região geográfica (Distritos de Santarém e Coimbra) apresentou diversidade alélica.

Em conclusão, os marcadores de microssatélites utilizados e analisados em gel de poliacrilamida, podem ser considerados mais informativos para estudos de diversidade populacional em *D. immitis* em Portugal do que a sequência da região ITS2.

**Palavras-chave:** Diversidade genética, estrutura populacional, *Dirofilaria immitis*, microssatélites.

## Abstract

Dirofilariasis is a disease caused by the parasitic nematode *Dirofilaria immitis*, which is transmitted by culicidae mosquitoes (*Aedes*, *Anopheles* e *Culex*). Canids and felids are definitive hosts, accidentally infecting humans.

The objectives of this study were to mount in laboratory, one panel of 11 microsatellites A2, A5, B5, H5, H4, E4, D2, A4, C2, H5, G9 e A05 described for *D. immitis*, evaluate their application in adult parasite and blood microfilariae, determine their diversity in different Portuguese regions, and compare with previously used genetic markers (ribosomal internal transcribed spacer 2 - ITS2).

A total of 23 samples were studied, including 11 adult worms, male and female, isolated from one dog, and 12 canine blood samples confirmed to *D. immitis* microfilariae.

The ITS2 region from adult worms was amplified by PCR, sequenced and compared to previously obtained sequences from blood and vector samples from Portugal and other countries. Eleven microsatellite markers were amplified by PCR. Microsatellite PCR products were confirmed by agarose gel electrophoresis and separated for genotyping in polyacrylamide gel electrophoresis.

Eight of the nine studied microsatellites were polymorphic, and generated a total of nine allelic profiles for the nine loci among adult worm samples, and 12 allelic profiles for the six loci that amplified both types of samples. Each geographical region (Santarém and Coimbra Districts), for blood samples, presented allelic diversity.

In summary, the studied microsatellite markers, and as analysed here in polyacrylamide gels, can be considered more informative for population diversity studies of *D. immitis* in Portugal than ITS2 sequencing.

**Keywords:** Genetic diversity, population structure, *Dirofilaria immitis*, microsatellites.

# Índice

	Páginas
Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Índice.....	iv
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Abreviaturas.....	viii
1. Introdução.....	1
1.1. Dirofilariose.....	1
1.2. Parasita e sua Morfologia.....	1
1.3. Descrição de Ciclo Biológico.....	2
1.4. Transmissão Vetorial.....	4
1.5. Infecção no Cão.....	4
1.6. Infecção no Humano.....	5
1.7. Patogenia.....	6
1.8. Diagnóstico.....	7
1.9. Tratamento.....	7
1.10. Epidemiologia Geral.....	8
1.10.1. Em Portugal.....	10
1.11. Diversidade genética em <i>Dirofilaria immitis</i> em Portugal.....	11
1.12. Microssatélites.....	12

1.13.	Objetivos .....	13
2.	Material e Métodos.....	14
2.1.	Amostras .....	14
2.2.	Extração de DNA.....	15
2.3.	Dosagem e avaliação da quantidade de DNA extraído.....	15
2.4.	Amplificação por PCR e sequenciação de ITS2.....	16
2.5.	Caracterização e análise filogenética de ITS2 .....	16
2.6.	Amplificação por PCR de microssatélites .....	16
2.7.	Caracterização de microssatélites .....	18
3.	Resultados.....	19
3.1.	Extração de DNA.....	20
3.2.	Amplificação por PCR e sequenciação por ITS2.....	20
3.3.	Amplificação de microssatélites por PCR.....	22
3.4.	Caracterização e microssatélites por el de poliacrilamida.....	24
3.5.	Análises de microssatélites.....	26
3.6.	Comparação da análise de microssatélites com sequência de ITS2....	28
4.	Discussão e Conclusões.....	30
5.	Referências Bibliográficas .....	34

# Lista de Figuras

		Página
Figura 1.	Dimorfismo sexual entre macho e fêmea de <i>D. immitis</i> .....	2
Figura 2.	Ciclo de vida do parasita .....	3
Figura 3.	Distribuição geográfica das dirofilarioses .....	9
Figura 4.	Prevalências mais altas de <i>D. immitis</i> encontradas em Portugal continental e na Madeira.....	11
Figura 5.	Produtos de amplificação de ITS2.....	20
Figura 6.	Alinhamento das sequências obtidas de vermes adultos para ITS2. ....	21
Figura 7.	Eletroferograma ilustrativo de heterozigotia na sequência de ITS2. ....	22
Figura 8	Perfis de seis loci de microssatélites obtidos em gel de poliacrilamida para amostras de vermes e sangue. ....	23 e 24
Figura 9	Árvore filogenética a partir de sequências de ITS2, usando o algoritmo Neighbor-joining.....	33



# Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1. Amostras de vermes adultos de <i>D. immitis</i> e de sangue de cão com microfilárias.....	14
Tabela 2. Primers usados para a amplificação por PCR de microssatélites.....	17
Tabela 3. Distribuição por locus dos tamanhos esperados e estimados dos produtos de amplificação em gel de agarose e poliacrilamida.....	25
Tabela 4. Distribuição dos cinco loci (H5, H4, A4, C2, E4) que apresentaram alelos nulos em amostras de verme e de sangue.....	24
Tabela 5. Distribuição de loci com alelos polimórficos em vermes e em sangue visualizados em gel de poliacrilamida.....	26
Tabela 6. Distribuição de nove perfis alélicos para nove loci para amostras de vermes.....	27
Tabela 7. Distribuição de doze perfis alélicos parciais (6 loci) para todas as amostras.....	27
Tabela 8. Comparação entre regiões geográficas.....	28
Tabela 9. Comparação entre sexos em vermes adultos.....	28

## Listas de Abreviaturas

AHS – American Heartworm Society

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs – Desoxirribonucleótidos trifosfato

EDTA – Ácido etilenodiamino tetraacético

ITS2 – Espaçador transcrito ribossomal interno 2

L1 – Primeiro estado larvar

L2 – Primeiro estado larvar

L3 – Terceiro estado larvar

L4 – Quarto estado larvar

L5 – Quinto estado larvar

OMS – Organização Mundial da Saúde

Pb – Pares de bases

PCR – Reação em cadeia da Polimerase

RFLP – Polimorfismo de comprimento dos fragmentos de Restrição.

RPM- Rotação por minuto

SSTRs – Repetições em tandem de sequências simples

TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA

Taq – *Thermus aquaticus*

TBE – Tampão Tris-Borato EDTA

TE – Tampão Tris-EDTA

# 1. Introdução

Em Portugal como noutros países, a dirofilariose cardiopulmonar é uma doença que constitui um problema para a Medicina Veterinária e para a saúde pública (Genchi, 2012). Para a deteção do agente etiológico, para o estudo da diversidade genética e estrutura populacional do nemátode parasita *Dirofilaria immitis* são usadas técnicas de biologia molecular.

## 1.1. Dirofilariose

A dirofilariose é uma doença parasitária cardiopulmonar causada por *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856), também conhecida por doença do verme do coração. Provocada por um nemátode parasita, acomete canídeos domésticos, silvestres e outros mamíferos incluindo o ser humano. É considerada como uma doença potencialmente zoonótica, com maior distribuição nas regiões de clima tropical, subtropical e temperado, sobretudo nas áreas com condições adequadas ao desenvolvimento de mosquitos. A dirofilariose é uma doença de importância para Medicina Veterinária e para a Saúde Pública pelas lesões que provoca nos animais domésticos, principalmente cães e gatos, e também em humanos (Vieira et al., 2014).

Desde a década de 70, que a Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a dirofilariose como sendo uma antropoonose, visto poder afetar humanos (Cruz, 2017).

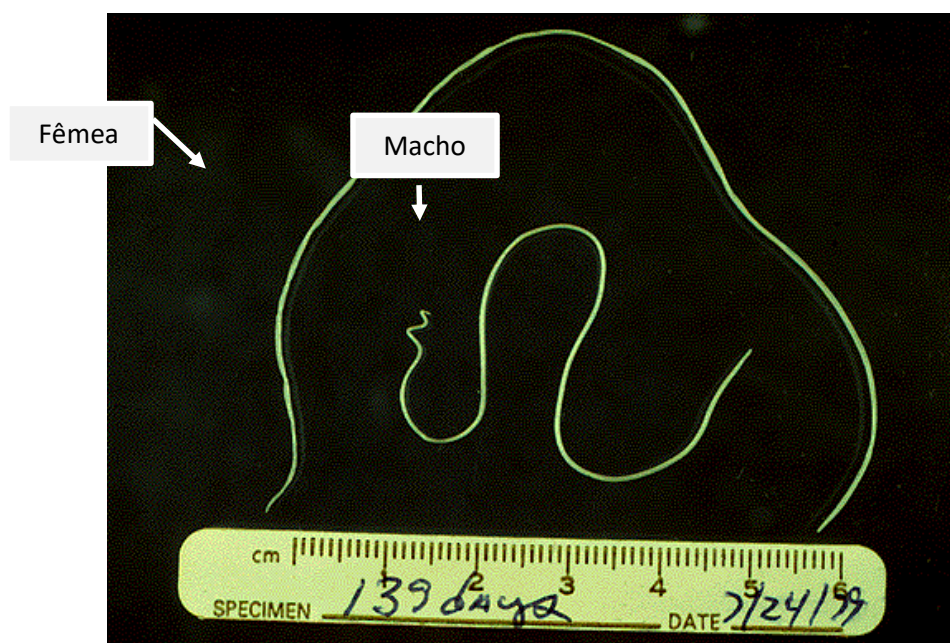
## 1.2. O Parasita e sua Morfologia

O primeiro estudo sobre a dirofilariose canina foi realizado por Francesco Birago (1626) citado por Alho et al. (2014b) em cães de caça no norte de Itália, embora tivesse feito uma identificação errónea. Em 1856 Leidy confirmou o agente como sendo *D. immitis*. Segundo a classificação sistemática proposta por Anderson (2000), a espécie *D. immitis* (Leidy, 1856) pertence ao Reino Animalia, Filo Nematelminthes, Classe Nematoda, Ordem Spirurida, Superfamília Filarioidea (Weinland, 1858), Família Onchocercidae (Leiper, 1911), Subfamília Dirofilarinae Sandgroup, 1921, Género *Dirofilaria* Raillet & Henry, 1911.

*Dirofilaria immitis* é caracterizada por um dimorfismo sexual acentuado. Os machos são filiformes e esbranquiçados, medem 12 a 20 cm de comprimento e apresentam a

extremidade afilada em espiral. As fêmeas são maiores, medindo 25 a 30 cm de comprimento e com a extremidade caudal arredondada (Belanger et al., 2011). (Figura 1).

As formas imaturas, denominadas microfíliarias, são encontradas na circulação sanguínea do hospedeiro, uma vez a fêmea ser ovovivípara. As microfíliarias chegam a medir 290-330  $\mu\text{m}$  de comprimento e 5-7  $\mu\text{m}$  de largura, apresentando a extremidade posterior afilada (Megat Abd Rani et al., 2010).



**Figura 1.** Dimorfismo sexual entre macho e fêmea de *D. immitis*. Fonte: <http://research.vet.upenn.edu/Hosts/Dirofilariaimmitis/tabid/7791/Default.aspx> (consultado 7-11-2017)

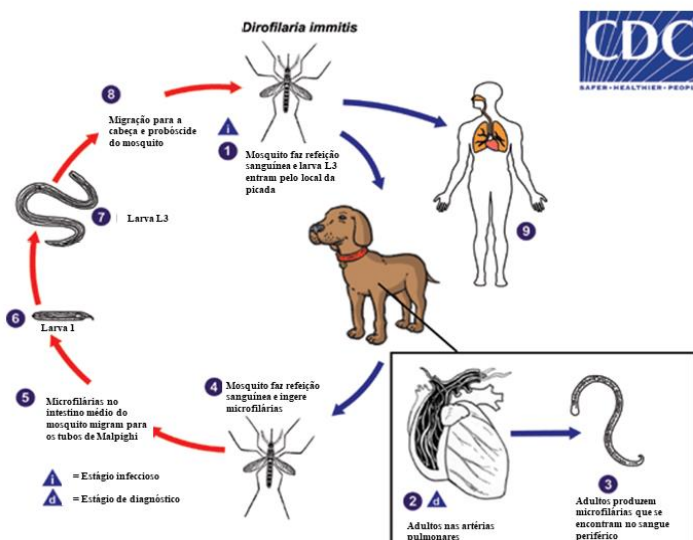
### 1.3. Descrição do Ciclo Biológico

A transmissão deste nemátode implica um vetor, que é hospedeiro intermediário, e que são mosquitos do gênero *Culex* (Díptera, Culicídea) (Abolfazl Ataie et al., 2015). Os hospedeiros definitivos são mamíferos, principalmente canídeos.

O ciclo de vida de *D. immitis* inicia-se com a refeição sanguínea de uma fêmea de mosquito, num hospedeiro vertebrado infectado, e a consequente ingestão de microfíliarias em circulação no sangue. No lúmen do intestino médio do mosquito esta

forma a larva migra para o hemocélio, desenvolve-se em larva do primeiro estágio (L1) e a primeira muda ocorre nas células dos túbulos de Malpighi do inseto aos 8 dias, onde penetra nas células primárias e se aloja no citoplasma. A conformação curta adquirida pelas L1 após a sua ingestão pelo mosquito facilita uma vida sedentária, permanecendo no interior do mosquito por 24 horas no estômago e após o que migram para os túbulos de Malpighi (Belanger et al., 2011). Num total de duas semanas a seguir à ingestão, as microfilárias passam por 2 estágios, L1 a L2, no mosquito. Seis dias depois, as larvas saem das células dos túbulos de Malpighi no terceiro estágio, a larva infectante (L3) (Belanger et al., 2011; Brown et al., 2012).

Estas larvas L3 migram através do corpo para a cabeça do inseto e acumulam-se nas partes bucais (Figura 2). Assim, em 2-3 semanas, a microfilária transforma-se numa larva infectante no vetor. As larvas infectantes penetram na pele do hospedeiro definitivo, pelas partes bucais do mosquito na altura da ingestão sanguínea, permanecendo no tecido subcutâneo. Após três dias passam para o quarto estadio (L4) e migram para outros tecidos subcutâneos, adiposos e musculares, onde se transformam no quinto estadio larvar, (L5). Neste estadio, completam a migração no interior do tórax do hospedeiro e chegam assim ao estadio adulto em 70 a 110 dias (Belanger et al., 2011), em que vão habitar as artérias pulmonares e ventrículo (Simón et al., 2012). (Figura 2).



**Figura 2.** Ciclo de vida do parasita. Fonte: CDC- Centro de Controlo e Prevenção de Doenças. Acedido aos 24.8.2017.

#### 1.4. Transmissão vetorial

A transmissão pelo vector tem muito a ver com a dinâmica entre quatro factores como sendo: o parasita, o vector, o hospedeiro vertebrado e o ambiente. Esta interação tem relação com as condições ambientais. A capacidade do vector transmitir a dirofilariose é influenciada por factores biológicos como sendo: a taxa de sobrevivência dos mosquitos ingurgitados no período de incubação, a proporção de mosquitos que se tornam infetantes com larvas L3 na cabeça e probóscide e o número de larvas L3 contidos nestes (Brown et al., 2012). Ainda que a população de mosquitos seja abundante, a transmissão de *D. immitis* só acontece quando as temperaturas cumulativas forem suficientemente altas para as formas larvares se desenvolverem até à forma de larvas infetantes L3 (Belanger et al., 2011). Nos géneros de mosquito *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* as larvas L3 resistem a temperaturas de 28-30°C por 8-10 dias; a 24°C por 11-12 dias e a 22°C por 16-20 dias. Estudos relatam ocorrer desenvolvimento larvar até 14°C, mas abaixo dos 14°C cessa o desenvolvimento larvar (Cancrini et al., 2007; Ferreira, 2015).

As mobilidades humanas, bem como o crescimento de grandes cidades, levaram à introdução de novos vectores na Europa e outros continentes (Otranto et al., 2013). As alterações climáticas registadas nos últimos anos, concomitantemente às variações de temperatura e precipitação, têm acarretado o aumento e a dispersão da população de vectores entre continentes (Ferreira, 2012).

#### 1.5. Infecção no cão

O parasita *D. immitis* é transmitido ao cão durante a refeição sanguínea feita pelo mosquito. A infecção do cão com *D. immitis* é assintomática na maioria dos casos, por conseguinte, os sinais clínicos dependem da duração da infecção e da carga parasitária (Kassai, 1999; Gomes, 2009). Geralmente são observadas no cão mudanças de comportamento, como agitação ou apatia. Pode registar-se uma perda de peso, como também a intolerância ao exercício físico (<http://www.cvbd.org/en/mosquito-borne-diseases/heartworm-disease/clinical-signs/>; consultado dezembro 2017). Alguns cães que apresentam vermes adultos no coração e na artéria pulmonar não apresentam microfilárias em circulação, sendo considerada uma infecção oculta. Esta situação pode acontecer em consequência da existência de parasitas de um único sexo, da resposta imune do

hospedeiro, levando à redução da fertilidade do parasita ou numa infecção pré-patente (Meireles et al., 2014).

A quantidade de microfilárias encontradas no sangue periférico de cães infectados com vermes adultos varia bastante, de zero a 100.000 microfilárias por mililitro de sangue. As microfilárias têm uma periodicidade característica no sangue periférico. Durante o dia permanecem nos capilares profundos e a partir das 18 horas circulam na corrente sanguínea, com o pico às 24 horas, e até às 3 horas da manhã. Essa periodicidade coincide com o período de hematofagia da fêmea do hospedeiro intermediário (Hayasaki et al., 2003; Alho et al., 2014b). A interferência no fluxo sanguíneo e a redução da função do bombeamento das artérias entre os tecidos profundos e a circulação periférica facilitam a infecção dos mosquitos durante a refeição sanguínea (Simón et al., 2012).

### **1.6. Infecção no ser humano**

Na dirofilariose em seres humanos, as larvas seguem uma trajetória semelhante àquela no hospedeiro canino, mas sem se desenvolver até à fase adulta, e portanto, sem produzir microfilárias nem chegando ao coração. Por isso, a dirofilariose não constitui uma zoonose de notificação obrigatória para a saúde pública, mas o difícil diagnóstico, que inclui procedimentos invasivos e altos custos, levam a *stress* na vida de quem é afectado (Shearer et al., 2011). Nas Américas e Europa a dirofilariose intrapulmonar em humanos é atribuída à espécie *D. immitis* (Pampiglione et al., 2009). Afetam principalmente os pulmões em humanos, onde se instalam com frequência nos vasos de pequeno calibre, provocando enfartes e lesões visíveis nas radiografias do tórax, como uma lesão em forma de moeda (Shearer et al., 2011).

A infecção é facilmente diagnosticada quando se pode notar um único nódulo pulmonar benigno e com bordos lisos e bem definidos. Para os humanos, a radiologia pulmonar associada à biópsia da lesão é conclusiva para o diagnóstico.

Ainda não existem riscos atribuídos a esta filariose nos humanos. Contudo, são referidas manifestações como a forma intravascular, a pulmonar e a forma cutânea. Na sua maior parte a dirofilariose em humanos é assintomática, contudo pode apresentar sintomas semelhantes aos dos caninos, como a tosse e dor no peito (Pampiglione et al., 2009). Em estudos feitos em Portugal sobre a Dirofilariose pulmonar humana, identificou-se um caso descrito como sendo dirofilariose ocular e dois casos de nódulos pulmonares achados

após a remoção cirúrgica, seguido de exame histopatológico (Araújo, 1996). Questionários enviados *online* a médicos sobre os seus conhecimentos, atitudes e práticas mostraram haver desconhecimento na prática clínica sobre esta parasitose (Belo et al., 2014).

### 1.7. Patogenia

A dirofilariose no cão é uma doença que se processa em duas fases: a chegada e a instalação das larvas do quinto estadio (L5) de *D. immitis* nas artérias pulmonares, sobretudo nas artérias dos lobos pulmonares caudais e, por outro lado, pela consequente morte dos nemátodes adultos (Meireles et al., 2014). Entre 3 a 6 meses após a infecção surgem os primeiros sinais clínicos distintos como a tosse, dificuldade respiratória e a intolerância ao exercício físico. O comprometimento dos vasos pulmonares surge em consequência dos traumatismos provocado pelas larvas L5, e está associado à toxicidade desencadeada pelas respostas imunitárias, dando origem a inflamação do endotélio (Meireles et al., 2014).

Com a chegada das larvas L5, cerca de 3-4 semanas pós-infecção, às artérias pulmonares, há uma redução do lúmen das artérias que vai levar a perda da integridade dos vasos e hipertensão pulmonar. Passados nove meses, o cão poderá ser acometido por uma insuficiência cardíaca congestiva, seguida de ascite e edema (Vieira, 2016).

A morte das larvas L5 provoca uma resposta imunitária muito forte no hospedeiro levando a fibrose dos vasos pulmonares. Com cargas parasitárias altas, aumenta a mobilidade, sobretudo das L5, em particular das artérias pulmonares até ao ventrículo, aurícula e veia cava (Meireles et al., 2014).

O Síndrome da veia cava aparece em consequência do comprometimento da função da válvula tricúspide, associado a hipertensão pulmonar, dando origem a insuficiência cardíaca direita que resulta em hepatomegália, hemólise intravascular e débito cardíaco diminuído (Vieira, 2016).

A segunda fase da doença ocorre com a morte dos nemátodes, quer por ação de fármacos com efeito adulticida, quer por causas naturais (Vieira, 2016). A maioria dos nemátodes filarioides que causam doenças em seres humanos e animais, incluindo *D. immitis*, *Onchocerca volvulus* e *Brugia malayi*, estão associados à bactéria simbiote intracelular, com transmissão transovariana, *Wolbachia* spp. Esta bactéria tem uma relação simbiótica



com o parasita *D. immitis*, pois a presença de *Wolbachia* é importante para a reprodução do parasita (Simón et al., 2012). Esta bactéria causa uma reação imune quando exposta ao sistema imunitário do hospedeiro (Kramer et al., 2005). Assim, a administração apenas de anti-helmínticos não previne as reacções inflamatórias, ainda que sejam eliminados os parasitas no hospedeiro (Gomes, 2009; Silva & Langoni, 2009; Meireles et al., 2014).

### 1.8. Diagnóstico

O diagnóstico no animal baseia-se nos sinais clínicos de disfunção cardiovascular e na detecção da presença de microfilárias no sangue ou por detecção de antígenos do parasita no sangue. A detecção de microfilárias pode ser feita, por exemplo, pelo método de gota espessa (Knight, 1977), pelo método de concentração de Knott modificado (Newton & Wright, 1956) ou por filtração em membrana de polycarbonato (Chularerk & Desowitz, 1970), citados por Brito et al., 2000. A detecção de antígenos do parasita adulto, por exemplo, pela técnica de imunoabsorção enzimática (ELISA) (Ettinger e Feldman, 2004, citado por Meireles et al., 2014) apresentada em testes rápidos, permite determinar o efeito da terapêutica adulticida.

Segundo Silva & Langoni (2009) o teste periódico de antígeno para o controlo da infecção é recomendado em cães para despiste de infecções ocultas por parasitas imaturos, por um único parasita ou por infecções com parasitas de único sexo e ainda por reacções imunológicas do hospedeiro contra as microfilárias. O diagnóstico conclusivo em humanos é a radiografia pulmonar associada à biópsia da lesão, uma vez que as lesões são autolimitadas e calcificadas, dando suspeita a uma neoplasia, quisto sebáceo, granuloma ou outras infecções.

Para Oh et al. (2017) os métodos atuais de escolha para o diagnóstico de *D. immitis* são os ensaios morfológicos baseados em microscopia, detecção de antígeno por Imunocromatografia ou ELISA e imagem de raios-X da principal artéria pulmonar e do coração direito.

### 1.9. Tratamento

O tratamento da dirofilariose acarreta um risco significativo de letalidade. A administração de dihidrocloridato de Melarsomina no tratamento adulticida é muito segura, mas a sua aplicação induz ao aparecimento de tromboembolismos pulmonar. É

administrado na dose de 2,5 mg/Kg, 2 injeções intramusculares, com um intervalo de 24 horas (Razi Jalali M. H. et al., 2011; Meireles et al., 2014).

Nos Estados Unidos da América (EUA) é recomendado, mensalmente durante todo o ano, o uso preventivo de anti-helmínticos, como as lactonas macrocíclicas, incluindo as avermectinas (ivermectina, selamectina) e as milbemicinas (moxidectina, milbemicina oxima), para evitar o desenvolvimento de estádios imaturos em vermes adultos (Bowman et al., 2016). Estas lactonas macrocíclicas são medicamentos usados na medicina veterinária como anti-helmínticos e ectoparasitas de largo espectro, no combate aos parasitas e nemátodes gastrointestinais em animais de companhia (Mendonça, 2007). Recentemente avaliou-se um protocolo modificado no tratamento da dirofilariose canina, uma combinação de doxiciclina (10 mg/kg durante 30 dias) e ivermectina (6 µg/kg/ a cada 15 dias durante 6 meses) (Mavropoulou et al., 2014).

Para a dirofilariose pulmonar humana, após a confirmação do diagnóstico a partir de exame histopatológico, procede-se à ressecção do nódulo e a cura é efectiva (Silva & Langoni, 2009).

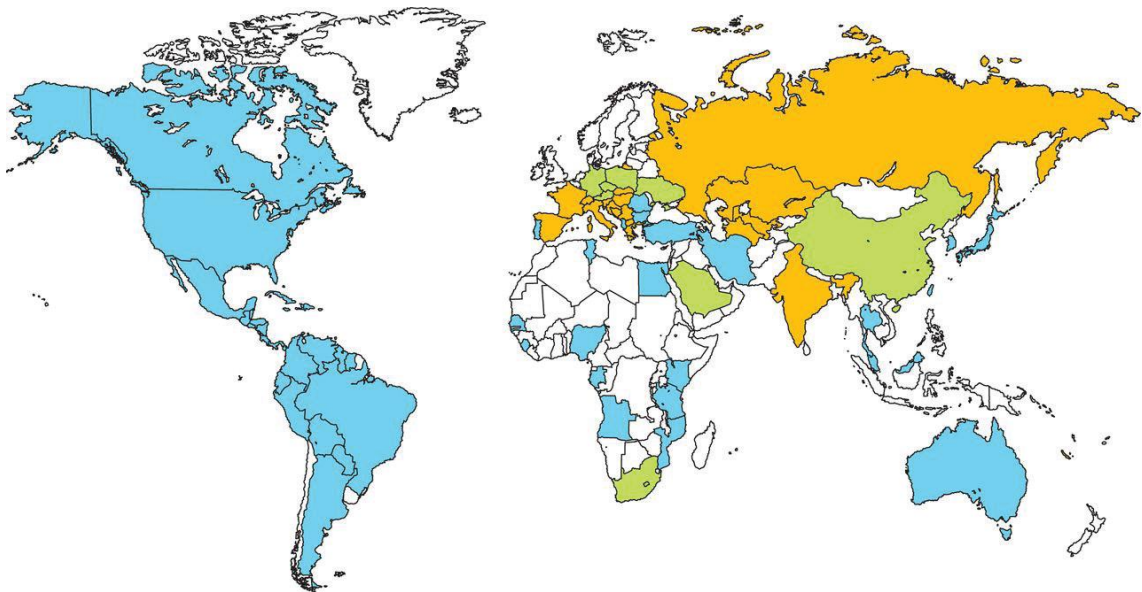
O uso de antibiótico, como a doxicilina, para a eliminação da bactéria simbiote *Wolbachia* spp provoca uma inibição do desenvolvimento da larva e por conseguinte, a esterilidade das fêmeas, aumentando a eficácia do tratamento anti-helmíntico. Para além disso, quando a doxicilina é administrada antes do tratamento adulticida com Melarsomina, observa-se uma redução da reação inflamatória produzida pela morte dos parasitas adultos (Meireles et al., 2014), diminuindo assim os riscos do tratamento anti-helmíntico.

#### **1.10. Epidemiologia geral**

Estudos de prevalência da dirofilariose na Europa mostram ter havido, nos últimos cinco anos, um aumento da prevalência nos países do Sul/bacia mediterrânica e uma significativa expansão autóctone de infecção canina por *D. immitis* e ou por *D. repens*, em particular no centro e norte do continente Europeu, áreas onde a dirofilariose não tinha sido relatada ou apenas casos esporádicos tinham sido documentados (Genchi, 2012; Alho et al., 2014a). Estudos recentes nos EUA identificaram um aumento da prevalência de dirofilariose canina que oscilou entre 3 a 19% (Simón et al., 2017). Vários factores são apontados para este aumento de prevalência e dispersão, como: as alterações climáticas e

o aquecimento global, que proporcionam condições favoráveis para os vectores artrópodes e a consequente resistência aos inseticidas proporcionando um maior desenvolvimento nas regiões não endémicas (Genchi, 2012). Por outro, a mobilidade de animais pela Europa, o número elevado de cães abandonados, o baixo poder económico dos protetores destes no acompanhamento, prevenção e tratamento da doença, são factores facilitadores na dispersão da doença (Morchón et al., 2012).

Num estudo sobre a dirofilariose atribuiu-se a distribuição mundial à facilidade de desenvolver larvas nos vetores, em climas temperados e tropicais (Alho et al., 2014a). A espécie *D. immitis* tem maior prevalência nas regiões temperadas, enquanto a espécie *D. repens* se distribui no Velho Mundo (Europa, África e Ásia), não tendo sido detectado nas Américas e Oceania. A distribuição das duas espécies na Europa difere, com *D. repens* presente principalmente na região Leste e *D. immitis* no Sudoeste da Europa (Figura. 3), coexistindo ambas no centro da Europa.

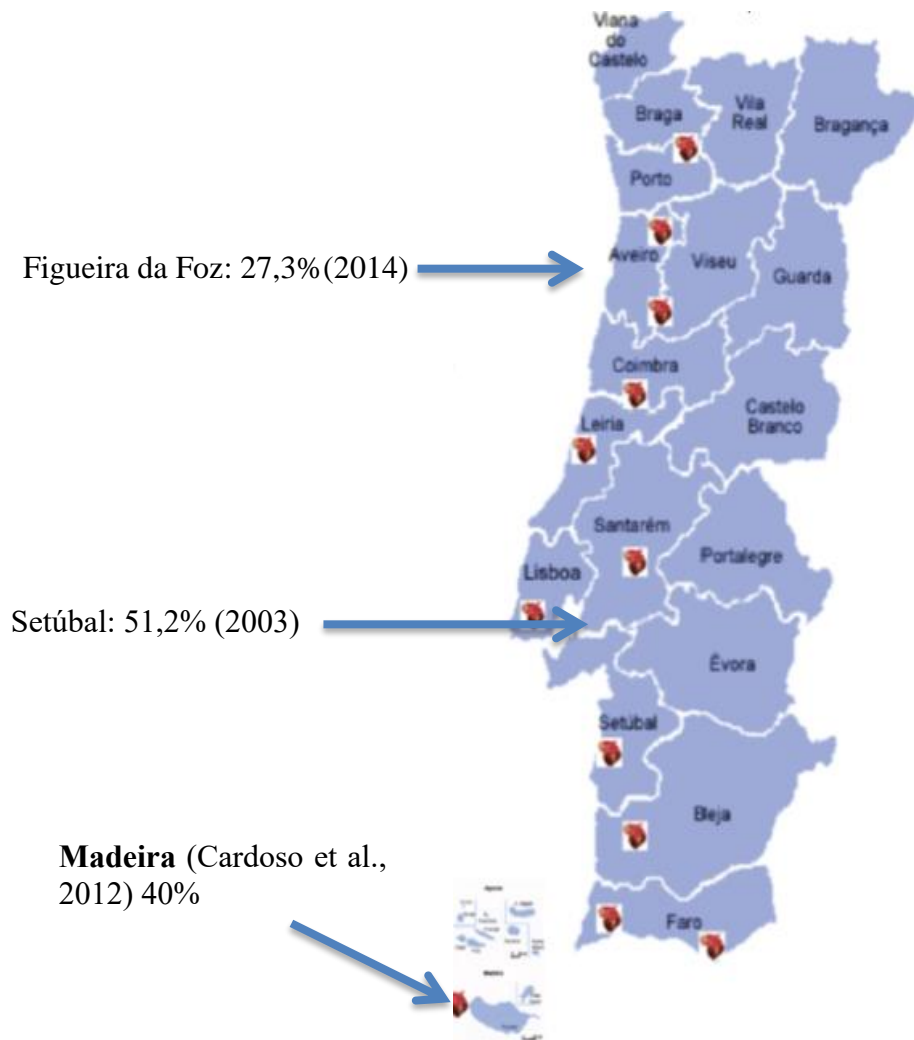


**Figura 3** - Distribuição geográfica das dirofilarioses. Azul – *D. immitis*; Laranja – *D. immitis* e *D. repens*; Verde – *D. repens*. Fonte: (Alho et al., 2014b).

### 1.10.1. Em Portugal

Cambournac & Simões (1943, citado por Vieira, 2016) acharam uma prevalência de 63,8% e 52,6% de dirofilariose canina em Portugal, através de pesquisa de microfilárias no sangue, respectivamente em Águas de Moura e na Herdade do Pinheiro, Setúbal. Atualmente, em Portugal, a infecção por *D. immitis* é considerada endêmica, e tornou-se uma doença parasitária do cão, de maior relevância para a Medicina Veterinária. Constituem regiões de maior preocupação as bacias fluviais do Tejo, Douro, Sado, Mondego e na ilha da Madeira (Alho et al., 2014a).

Araújo (1996) achou prevalências da dirofilariose canina de 2,1% no Centro-norte e Norte de Portugal, 16,7% no Ribatejo, 16,5% no Alentejo e 12% no Algarve. Contudo, a maior prevalência, 30%, foi achada na Ilha da Madeira (Araújo, 1996; Morchón et al., 2012). Balreira et al. (2011) acharam uma sero-prevalência de 2,1% no Centro Norte e Norte de Portugal e foram encontradas percentagens de 8,8% em Coimbra e de 6,8% em Aveiro. No ano seguinte (2012), Cardoso et al., para comparar os animais assintomáticos com os que apresentavam sintomas de dirofilariose canina, fizeram um rastreio serológico, tendo-se encontrado prevalências, respetivamente, de 2,9% e 3,4% no Norte de Portugal, 0,9% e 7,4% para a região Centro, 2,4% e 5,8% para Lisboa, 4,7% e 14,0% para o Alentejo, 5,1% e 17,1% para o Algarve, 0% para os dois grupos de animais dos Açores e 40,0% para os cães assintomáticos da Madeira. Ferreira et al. (2017) pesquisaram três Distritos de Portugal, Coimbra (região Norte-Centro), Santarém (região Centro-Centro) e Setúbal (Sul- Região Central) em três anos (2011, 2012 e 2013), onde foi observada maior prevalência de 24,8% em Setúbal, 13,8% em Coimbra e 13,2% em Santarém (Figura 4). Para além da população canina, os hospedeiros silváticos podem ter um papel importante na endemidade e transmissão da dirofilariose. Um estudo realizado entre 2008 e 2010 em carcaças de raposas vermelhas, detetou antígenos de *D. immitis* em 8,4%, no Norte (distritos de Braga, Bragança, Porto, Viana do Castelo e Vila Real), no Centro (distrito de Aveiro) e no Sul (distritos de Évora e Setúbal) (Cruz, 2017).



**Figura 4.** Prevalências mais altas de *D. immitis* encontradas em Portugal continental e na Madeira. Fonte: Alho et al. (2014)

### 1.11. Diversidade genética em *Dirofilaria immitis* em Portugal

A diversidade genética é o grau de variedade dos genes existentes dentro de uma única espécie (Moraes et al., 2003). Ferreira et al. (2017) usaram protocolos moleculares baseados na detecção e diferenciação de espécies de filárias em Portugal, usando as técnicas de PCR- Multiplex e RFLP, para a detecção simultânea de diferentes espécies de *Dirofilaria* spp tanto no vetor, quanto no sangue. A região ITS1 (espaçador ribossomal

transcrito interno 1) não amplificou amostras com baixa microfilarémia. A reação de amplificação da região ITS2 (espaçador ribossomal transcrito interno 2) foi mais sensível e mais polimórfico. Contudo, a diversidade genética encontrada para ITS2 foi muito baixa, não permitindo realizar estudos de genética populacional.

### 1.12. Microssatélites

Os microssatélites estão entre os marcadores moleculares de DNA mais aplicados devido ao seu fácil uso por PCR simples como também pelo alto grau de polimorfismo, sendo mais informativos. Os microssatélites ganharam uso generalizado no mapeamento do genoma, genética, filogenética e de conservação devido à sua abundância em organismos eucarióticos (Teneva et al., 2014).

Os microssatélites como marcadores moleculares têm demonstrado ser vantajosos, por serem co-dominantes, ou seja permitem distinguir heterozigotos dos homozigotos. Apresentam uma vasta distribuição genômica, e sendo de pequeno tamanho são facilmente amplificados por PCR, e podem ser analisados através de eletroforese por análise manual ou automática. São fáceis de identificar e amplificar e assim, permitem analisar material genético em pouca ou grande quantidade (Teneva et al., 2014).

Contudo, uma das limitações ao uso dos microssatélites é a presença de alelos nulos, assim como a dificuldade em distinguir diferentes alelos, principalmente quando apresentam pequenas diferenças (1 ou 2 pb) de distância, sobretudo quando separados em géis de poliacrilamida (Teneva et al., 2014). Outras desvantagens incluem que, para a identificação de cada locus, a sua região flanqueadora deve ser sequenciada para se poder desenhar os *primers* de PCR.

Em *Dirofilaria* spp os únicos microssatélites descritos até agora foram identificados por Belanger et al. (2011), que desenvolveram um painel de 11 marcadores de microssatélites polimórficos para *D. immitis* e que foram utilizados para analisar a genética populacional deste nemátode parasita nos EUA. Das nove regiões geográficas mapeadas encontrou-se maior variação genética entre amostras individuais.

### 1.13. Objectivos

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a aplicação de microssatélites no estudo da diversidade genética e estrutura populacional do nemátode parasita *D. immitis* em Portugal.

Os objetivos específicos foram:

- a) Montar, no laboratório, um painel de 11 microssatélites descritos para *D. immitis*;
- b) Avaliar a aplicação em parasitas adultos e microfilárias no sangue;
- c) Determinar a sua diversidade por regiões em Portugal;
- d) Comparar com outros marcadores previamente usados (ITS2).





## 2. Material e Métodos

### 2.1 Amostras

Foram usadas um total de 23 amostras, sendo 11 amostras de vermes adultos de *D. immitis* codificadas como sendo 1V-11V, provenientes de um só cão, conservados em álcool e gentilmente cedidos pelo Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho, Professor da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. As doze amostras de sangue de cão, codificadas de 1S-12S, tinham sido previamente confirmadas como infetadas com *D. immitis* obtidas no âmbito do projecto PTDC/SAUSAP/113523/2009, financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia em Lisboa e cedidos pela Professora Doutora Silvana Belo, Professora do IHMT.

**Tabela 1.** Amostras de vermes adultos de *D. immitis* e de sangue de cão com microfilárias.

Vermes adultos		Sangue com microfilárias		
Código	Sexo	Código	Nº amostra	Região
1V	M	1S	102	Santarém
2V	M	2S	27	Santarém
3V	M	3S	132	Santarém
4V	M	4S	186	Santarém
5V	M	5S	197	Santarém
6V	F	6S	221	Coimbra
7V	F	7S	228	Coimbra
8V	F	8S	251	Coimbra
9V	F	9S	263	Coimbra
10V	F	10S	273	Coimbra
11V	F	11S	293	Coimbra
		12S	311	Santarém

## 2.2. Extração de DNA

Para a extração do DNA de sangue infetado com *D. immitis* utilizou-se 1ml de sangue de cada amostra, centrifugado para concentrar as células e microfilárias. Para extração do DNA de vermes adultos, conservados em etanol a 70%, uma porção de 2cm foi cortada com bisturi de machos ou fêmeas.

Na extração de DNA das amostras, tanto de vermes adultos de *D. immitis* como de sangue de cão, seguiu-se o método de CTAB (Borges et al., 2009). Cada secção de verme ou amostra de sangue foi colocada em 300µl de CTAB (brometo de cetil trimetil amónia) depois de aquecido a 56°C, por 10 minutos. Macerou-se os vermes ou sedimento e acrescentou-se mais 300µl de CTAB. Adicionou-se 10µl de Proteinase K (20mg/ml- Bioline), a seguir homogeneizou-se e incubou-se a 56°C por 90 minutos com agitação. Em seguida adicionou-se 600µl de Clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), e, após agitação por inversão durante 2 minutos, centrifugou-se por 20 minutos a 16000g. Transferiu-se o sobrenadante para outro tubo, precipitou-se o DNA adicionando 800µl de 100% etanol gelado e foi colocado a -20°C durante 1 hora. Em seguida deixou-se estabilizar à temperatura ambiente e voltou-se a centrifugar durante 20 minutos a 16000g. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* com 500µl de etanol a 70%, agitou-se e centrifugou-se por 15 minutos a 16000g. Retirou-se o sobrenadante e secou-se a 56°C por 15 minutos. Para a reidratação do *pellet*, adicionou-se 50µl de tampão TE (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0- “AppliChem”) e as amostras foram armazenadas a 4°C.

## 2.3. Dosagem e avaliação da quantidade de DNA extraído

A determinação da pureza e quantidade de DNA foi feita por espectrofotómetro Thermo Scientific, NANODROP™ 1000, a uma absorvância de 260/280 nm bem como a relação 260/230, descrito por Sambrook et al. (2001). Verificou-se a qualidade e integridade de DNA em electroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE (Tris- Acetato- EDTA) com 5µl de brometo de etídio (10mg/ml) por 100ml de agarose, a 120 Volts (35 mA) por 30 minutos. A 5µl de solução de DNA de cada amostra adicionou-se 2µl de tampão corante (5x DNA, Buffer, Blue, Bioline). Como referência usou-se 5µl de marcador 50pb (*HyperLadder*- Bioline). O gel foi visualizado sob luz ultravioleta em transiluminador (*Alphalmager* HP System).

## 2.4 Amplificação por PCR e sequenciação de ITS2

A reação de PCR para amplificação de ITS2 foi feita para um volume final de 25µl, com 1µl de DNA, 1µl de cada primer (10µM STAB VIDA), 4µl MgCl<sub>2</sub> (25mM Promega), Buffer Flexi (5X Green Promega), 2,5µl dNTPs (8mM, Bioline), 0,1µl *Taq* Polimerase (10U/µl, Promega). As reações decorreram no Termociclador “*Primus 96 advanced gradient*” de acordo com o seguinte perfil térmico: 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos, a 94°C por 15 minutos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, com uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os primers foram DIDR-F1 e DIDR-R1 (Rishniw et al., 2006)

Feita a amplificação, os produtos foram separados por electroforese a 1% em gel de agarose, seguidamente foram corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador (*Alphalmager HP System*).

## 2.5 Caracterização e análise filogenética de ITS2

Sequenciou-se os produtos de amplificação de ITS2 a partir de vermes usando os mesmos *primers* já usados para PCR: 10µl do produto de PCR, adicionado 3µl de primer pan-filarial (DIDR-F1 e DIDR-R1) e foi realizada comercialmente (StabVida).

As sequências obtidas foram verificadas no programa Chromas Lite (Technesium) e alinhadas no programa BioEdit7 (Hall, 1999). Confirmou-se a identidade das sequências e obteve-se sequências de ITS2 de outras amostras de *D. immitis* através de pesquisa por BLAST.

As sequências obtidas neste estudo em conjunto com outras sequências já publicadas de ITS2 de *D. immitis* foram alinhadas em BioEdit. O alinhamento de sequências de ITS2 foi usada para gerar uma árvore filogenética no programa Mega7 (Kumar *et al.*, 2016), usando o algoritmo Neibor-Joining. Para análise de sequências de ITS2 foi usado o modelo Tamura-3-parameter, que foi o modelo considerado mais apropriado para os dados de acordo com o programa Mega7.

## 2.6. Amplificação por PCR de microssatélites

Amplificou-se 11 loci de microssatélites A2, A5, B5, H4, E4, D2, A4, C2, H5, G9 e A05 (Belanger et al., 2011), com os primers indicados na Tabela 2.

As reacções de PCR para amplificação de microssatélites e de ITS2 foram feitas para um volume final de 25µl, com 1µl de DNA, 1µl de cada Primer (10µM *StabVida*), 4µl MgCl<sub>2</sub> (25mM Promega), Buffer Flexi (5X Green Promega), 2,5µl dNTPS (8mM, Bioline), 0,1µl *Taq* Polimerase (10U/µl, Promega).

**Tabela 2.** Primers usados para a amplificação por PCR de microssatélites

<b>Locus</b>	<b>Sequências de Oligonucleotídeos</b>	<b>Tamanho esperado do fragmento (Pb)</b>
A2F	5'GAAT CAA TCG GGG GAA ATG - 3'	225-292
A2R	5'GTT TCT TAA ATG CAA ATG CTC CGT TGT3'	
A5F	5'TTC ATT TCA AGC CAC AGC AG3'	193-217
A5R	5'GTT TCT TGG GAA TCC CAG GTG TTG TAG3'	
B5F	5'TTT GGT TAT AAA AAG AAT GGA CA3'	271-317
B5R	5' GTT TCT TTC GCC TAA AAA GAT AGT GCAA3'	
G9F	5'GAT GTT GCT GCG ATT GTT GT3'	135-159
G9R	5'GTT TCT TCC TCA ACA ACG ATT ACG TTT3'	
H4F	5'GAA TAC AAC GCA AAC CGT CC3'	200-218
H4R	5'GTT TCT TCT GCG CTA AAC AAT GCA AAA3'	
E4F	5'GCT TGC ACT TCG TCC TTT TC3'	141-171
E4R	5'GTT TCT TGT ATG TGT GTG TAA GCG TGT G3'	
D2F	5'CGA ATT ATT ACT ACT ATC GCC G3'	113-125
D2R	5' TGA GGA GGA GAA GAA GAA GAG A3'	
A4F	5'CAT GTT ATA CAG GGG CGT GA3'	225-253
A4R	5'ATT CGG GAC AAT ACA CTG CC3'	
C2F	5'TTT GGT TAT AAA AAG AAT GGA CA3'	265-305
C2R	5'TTC GCC TAA AAA GAT AGT GCA A3'	
H5F	5'CAC CAA CGA ATA TCA CCG TTT3'	272-314
H5R	5'GCT TCA ACA AAA CAA CAA ACA CA3'	
A05F	5'CAT TGT TGT CGT GAT CGC T3'	199-226
A05R	5'AGC AAC AGC AGC ATT AGC A3'	

As reações decorreram no Termociclador “Primus 96 advanced gradient”. A amplificação de microssatélites decorreu de acordo com o seguinte perfil térmico: 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos, a 94°C por 15 minutos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, com uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Feita a amplificação os produtos foram separados por electroforese a 1% em gel de agarose, posteriormente corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador (*Alphalmager Hp System*), para confirmação da amplificação e qualidade dos produtos obtidos.

## **2.7. Caracterização de microssatélites**

Os produtos confirmados de amplificação de microssatélites foram separados em gel de poliacrilamida para melhor diferenciar fragmentos com tamanhos próximos. Cada gel de poliacrilamida foi preparado para um volume final de 40 ml, com 8 ml solução *stock* de 30% de poliacrilamida (Wang et al., 2003), 4 ml Tampão TBE 5X (Tris-borato-EDTA buffer: 89 mM Tris-borato, 2 mM EDTA), 260 µl 10% (W/V) persulfato de amónia, e 70 µl TEMED (NNN’N’ tetrametiletilenodiamina) e 28 ml H<sub>2</sub>O destilada. O gel foi polimerizado entre duas placas de vidro de 18 cm x 15,5 cm, com Tampão 0,5X TBE (Sambrook et al., 1989). Os fragmentos foram separados por eletroforese vertical a 250V, durante 2 a 4 horas, dependendo o tempo do tamanho dos fragmentos esperados. O gel foi corado em tampão 0,5X TBE com 5 µl de brometo de etídio (10 mg/ml) por 3 minutos, e visualizado sob luz ultravioleta em transiluminador (*Alphalmager HP System*). Os fragmentos de microssatélites foram codificados como alelos em tabela.



### 3. Resultados

#### 3.1. Extração de DNA

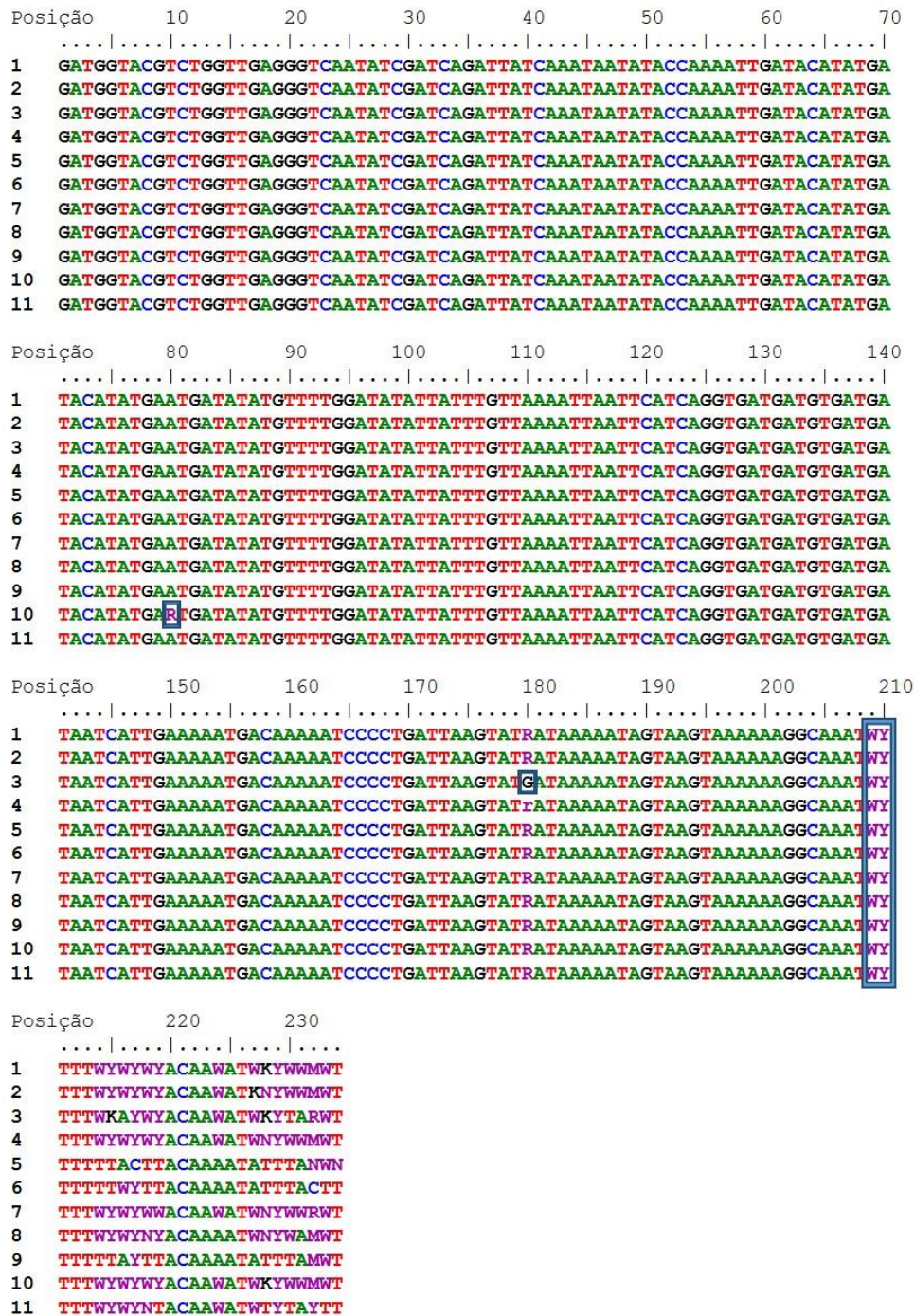
De um total de 23 amostras, sendo 11 de vermes adultos machos e fêmeas de *D. immitis* e 12 de sangue de cão com microfilarémia confirmada previamente, obteve-se DNA, confirmados por electroforese em gel de agarose e quantificado por espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000).

#### 3.2. Amplificação por PCR e sequenciação por ITS2

A região ITS2 foi amplificada por PCR para todas as amostras, tendo-se obtido a banda esperada de 542 pb (Figura 5). Os produtos de ITS2 de vermes adultos foram sequenciados, tendo todos sequências indistinguíveis, exceto a amostra 10V, que aparenta ser heterozigótica (R) na posição 80 e a amostra 3V, homozigótica (G) na posição 180 (Figura 6). Todas as amostras mostraram heterozigotia, ou pelo menos dois alelos, a partir da posição 209 (Figura 7), que se deteta pela presença de picos duplos (Figura 8).

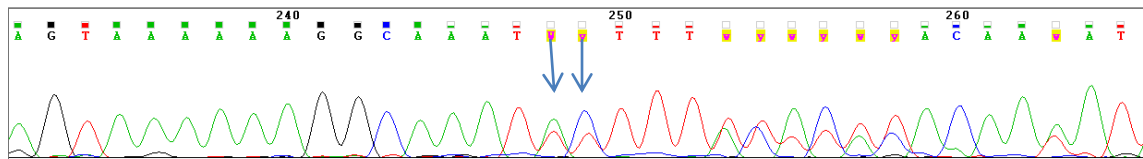


**Figura 5.** Produtos de amplificação de ITS2. Os produtos (542 pb) de vermes adultos (1V-11V) foram separados em gel de agarose a 1%, 30 minutos, 120V. C+: controlo positivo; C-: controlo negativo. Marcador molecular 50pb (M).



**Figura 6.** Alinhamento das sequências obtidas de vermes adultos para ITS2. 1-11: Amostras vermes adultos. As caixas indicam regiões polimórficas ou com heterozigotia.



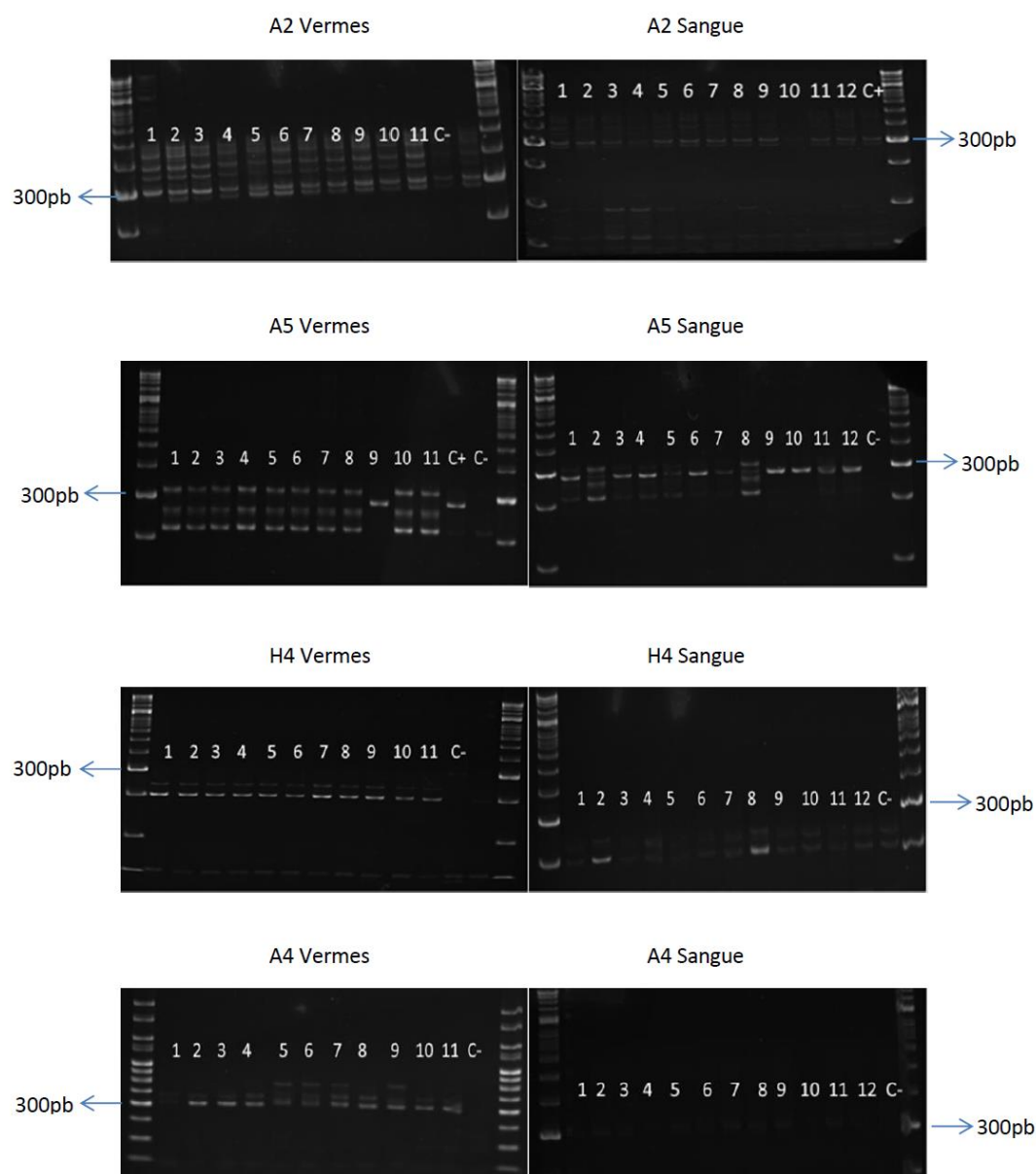


**Figura 7.** Eletroferograma ilustrativo de heterozigotia na sequência de ITS2. Amostra 2V, mostrando a região onde aparece uma sequência de picos duplos, com início neste segmento pelas posições assinaladas pelas setas e com os códigos w (A e T) e y (T e C).

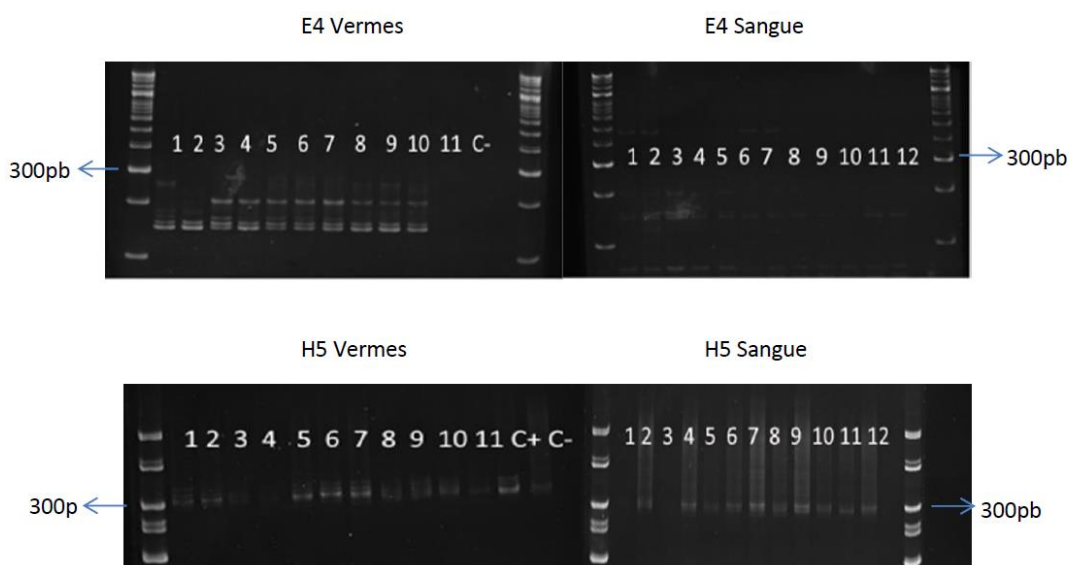
### 3.3. Amplificação de microssatélites por PCR

O painel de 11 microssatélites foi aplicado num total de 23 amostras, dos quais 9 loci (A2, B5, H4, C2, D2, E4, A5, A4, H5) amplificaram fragmentos de tamanhos esperados e visualizados em gel de agarose a 1% e, destes, três loci (C2, D2, B5) não amplificaram em sangue de cão. Nas amostras de sangue, o parasita *D. immitis* tinha sido detetado anteriormente por PCR no âmbito do projecto PTDC/SAUSAP/113523/2009.

Os dois pares de primers (G9 e A05) para os quais não foi possível obter produtos de amplificação foram excluídos da análise, após várias experiências sem sucesso, incluindo adição de Albumina sérica bovina (BSA) numa diluição de 1:10 e 1:100 e Dimetilsulfóxido (DMSO) em 1:10.



**Figura 8. (continua)**



**Figura 8.** Perfis de seis loci de microssatélites obtidos em gel de poliacrilamida para amostras de vermes e sangue. Eletroforese dos produtos de amplificação dos loci A2, A5, H4, A4, E4 e H5, por 3 horas, 250Volt. C+: controlo positivo; C-: controlo negativo. Marcador molecular 50pb, sendo indicada a banda correspondente a 300pb. Locus A2. Bandas esperadas 252-292pb. Bandas observadas 290-300pb. Locus A5. Bandas esperadas: 193-217pb. Bandas observadas: 280-300pb. Locus H4. Bandas esperadas: 200-218pb. Bandas observadas: 200-210pb. A4. Bandas esperadas: 225-253pb. Bandas observadas: 200-250pb. Locus E4. Bandas esperadas: 141-171pb. Bandas observadas: 170-200pb. Locus H5. Bandas esperadas: 272-314pb. Bandas observadas: 280-300pb.

### 3.4. Caraterização de microssatélites por gel de poliacrilamida

Os loci de microssatélites amplificados por PCR foram separados em gel de poliacrilamida (Figura 8). Obteve-se produtos em 9 dos 11 loci testados para os tamanhos de fragmentos esperados e visualizados em gel de poliacrilamida. Três dos nove loci (C2, D2 e B5) não amplificaram para o DNA nas amostras de sangue, e foram estudados apenas para amostras de vermes (Tabela 5).

**Tabela 3.** Distribuição por locus dos tamanhos esperados e estimados dos produtos de amplificação em gel de agarose e poliacrilamida.

<b>Locus</b>	<b>Tamanho esperado do fragmento (pb)</b>	<b>Tamanhos estimados obtidos em agarose (pb)</b>	<b>Tamanhos estimados obtidos em poliacrilamida (pb)</b>
A2	252-292	300-300	290-300
A5	193-217	200-250	280-300
B5	271-317	2800-300	280-300
H4	200-218	250-270	210-210
E4	141-171	180-200	170-200
D2	113-125	200-270	200-200
A4	225-253	270-300	200-250
C2	265-305	280-300	300-300
H5	272-314	280-300	280-300

**Tabela 4.** Distribuição dos cinco loci (H5, H4, A4, C2, E4) que apresentaram alelos nulos em amostras de verme e de sangue.

<b>Locus</b>	<b>Número de amostras com alelos nulos</b>	<b>Tipo de amostras com alelos nulos</b>
H5	1	vermes
H4	2	1 verme, 1 sangue
A4	3	1 verme, 2 sangue
C2	3	vermes
E4	1	vermes

**Tabela 5.** Distribuição de *loci* com alelos polimórficos em vermes e em sangue visualizados em gel de poliacrilamida. Três em 9 loci (C2, D2, B5) não amplificaram em sangue de cão.

Locus	Alelos totais	Alelos vermes	Alelos Sangue
A2	2	2	2
A5	2	2	2
B5	2	2	(não amplificou)
H4	1	1	1
E4	2	2	2
D2	2	2	(não amplificou)
A4	2	2	1
C2	2	2	(não amplificou)
H5	2	2	2

### 3.5. Análises de microssatélites

Relativamente à análise feita para os nove loci de microssatélites nas amostras de vermes adultos identificou-se um grande número de perfis de características heterozigóticas. Sete perfis alélicos foram encontrados apenas numa amostra e dois perfis em duas amostras (Tabela 6). Em contraste, na análise parcial de seis microssatélites, para vermes adultos e microfilárias em sangue canino, o perfil alélico parcial mais comum foi PAP-2, em cinco amostras, e três perfis parciais (PAP-2, 3 e 4) foram encontrados em ~50% das amostras (12/23).

Na análise geográfica de distribuição dos perfis alélicos, Santarém apresentou maior número de perfis alélicos parciais (cinco) que Coimbra, apenas com três com perfis alélicos, em seis amostras cada (Tabela 8). Os dois distritos apenas apresentaram um perfil alélico em comum (PAP-9, com uma amostra).

Quanto à distribuição por sexos, quase todas as amostras apresentaram perfis alélicos diferentes, apenas se tendo observado um perfil idêntico (PA4) (Tabela 9).

Relativamente à diversidade entre os dois marcadores usados, os microssatélites e ITS2, observou-se três vezes mais perfis de microssatélites do que de ITS2, respetivamente 9 e 3, em vermes adultos.

**Tabela 6.** Distribuição de nove perfis alélicos para nove loci para amostras de vermes.

Perfil alélico	Locus									Nº de amostras
	A2	A5	B5	H4	E4	D2	A4	C2	H5	
1	1.1	2	1.1	1	2	2	2	1.2	1.1	1
2	1.2	2	1.2	1	2	2	2	1.2	2	1
3	1.2	2	1.2	1	1.2	2	2	1.2	2	2
4	1.2	2	1.2	1	1.2	2	2	1.2	2	2
5	1.2	2	1.2	1	1.2	1.2	1.2	0	2	1
6	1.2	2	1.2	1	1.2	1.2	1.2	0	2	1
7	1.2	2	1.2	1	1.2	1.2	1.2	1.2	2	1
8	1.2	2	1.2	1	1.2	2	1.2	1.2	2	1
9	1.2	1.1	1.2	1	1.2	1.2	1.2	1.2	2	1

**Tabela 7.** Distribuição de doze perfis alélicos parciais (6 loci) para todas as amostras.

Perfil alélico parcial (PAP)	Locus						Nº de amostras
	A2	A5	H4	E4	A4	H5	
1	1.1	2	2	2	2	1.1	1
2	1.2	2	2	2	2	2	5
3	1.2	2	2	1.2	1.2	2	3
4	1.2	1	2	1.2	1.2	2	4
5	1.2	2	2	1.2	1.2	2	1
6	1.2	1.1	2	1.2	1.2	2	1
7	1.2	2	0	1.2	0	0	1
8	1.2	2	1.2	2	1.2	2	1
9	1.2	1.1	2	2	2	1.1	2
10	1.1	2	2	1.2	2	2	2
11	0	2	0	2	0	2	1
12	1.2	2	2	2	0	2	1

**Tabela 8.** Comparação entre regiões geográficas.

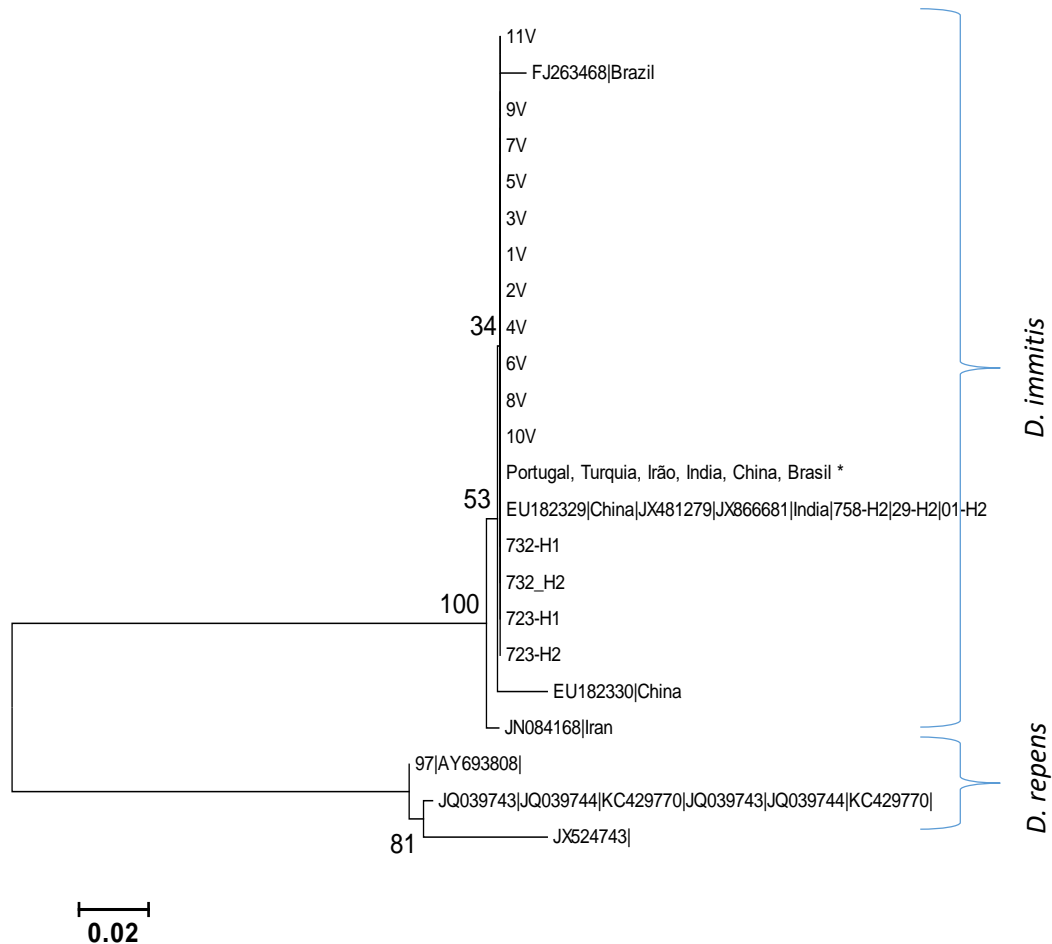
<b>Distrito</b>	<b>Nº amostras</b>	<b>Nº de perfis alélicos parciais (PAP)</b>	<b>Perfis alélicos parciais (PAP) (nº de amostras)</b>
<b>Santarém</b>	6	5	8 (1), 9 (1), 10 (2), 3 (1), 12 (1)
<b>Coimbra</b>	6	3	2 (4), 9 (1), 10 (1)

**Tabela 9.** Comparação entre sexos em vermes adultos.

<b>Sexo</b>	<b>Nº amostras</b>	<b>Nº de perfis alélicos (PA)</b>	<b>Perfis alélicos (PA) (nº de amostras)</b>
<b>Machos</b>	5	4	1-4 (1 cada; 2 amostras perfil 3)
<b>Fêmeas</b>	6	6	4-9 (1 cada)

### 3.6. Comparação da análise de microsatélites com sequência de ITS2

A árvore filogenética produzida a partir de sequências de ITS2, usando o algoritmo Neighbor-Joining, com o modelo mais apropriado (Tamura-3-parameter), mostrou que as sequências obtidas neste trabalho para as amostras de vermes adultos pertencem à espécie *D. immitis* e são indistinguíveis entre si e de várias outras sequências disponíveis nas bases de dados de regiões geográficas diferentes (Europa, Ásia e América do Sul), assim como de amostras de microfilárias detetadas em sangue de cão e mosquitos, obtidas no projeto anterior em Portugal (Figura 9).



**Figura 9.** – Árvore filogenética a partir de sequências de ITS2, usando o algoritmo Neighbor-joining. Distâncias calculadas usando o modelo Tamura-3-parameter. Bootstrap com 1000 réplicas. Grupo externo: *D. repens*. Amostras 732, 723, 758 foram obtidas de mosquitos, e as amostras 29 e 01 de sangue de cão, em Portugal. H1 e H2: haplótipos inferidos de sequências heterozigóticas. Na árvore: \*: FJ263455, FJ263457, FJ263464, FJ263458, FJ263466, FJ263467, FJ263459, FJ263460, FJ263463, FJ263461, FJ263465, FJ263456: Brasil; EU182331: China; JN084166, JX889634, JX8896351, JX889636, JX889637, JX889638: Irão; KF273906.1, KF273905.1: Turquia; EU087699: Índia; LN626267.1, LN626266.1, LN626264.1, LN626263.1, LN626262.1, LN626265.1: Portugal; amostras 483-H1, 758-H1, 29-H1, 01-H1, 483-H2, 52-H1, 52-H2.



## 4. Discussão e Conclusões

A variabilidade genética dentro de uma espécie de parasita deve ser entendida de forma a compreender-se e evitar-se a sua dispersão e implementar programas para o seu controlo. As sequências de ITS2 não permitem distinguir de entre a maioria dos isolados de *D. immitis*, tanto em Portugal como noutras regiões. Contudo, são úteis, dado permitirem realizar a identificação molecular e detetar filárias com alta sensibilidade, permitindo a detecção simultânea e a consequente diferenciação entre as espécies.

A amplificação do painel de microssatélites desenvolvido por Belanger et al. (2011) em amostras portuguesas foi, no geral, mais eficaz em DNA de vermes adultos. Alguns loci de microssatélites (D2, C2, B5), não amplificaram DNA de microfilárias em sangue de cão, o que diminuiu o número de loci que se pôde analisar para todas as amostras. Verificou-se um maior número de alelos nulos em amostras de microfilárias em sangue de cão. Esta não amplificação ou presença de alelos nulos pode refletir uma menor eficácia da amplificação neste tipo de amostras, que pode ser devido à menor quantidade de DNA do parasita, ou presença de contaminantes, ou interferência do DNA do hospedeiro, ou ainda a mutações no local de hibridação de pelo menos um dos primers. Já no estudo anterior (Belanger et al., 2011) tinham sido achados alelos nulos que poderiam ter sido causados por uma mutação numa das regiões de hibridação dos primers, tendo sido procurados painéis alternativos de microssatélites sem sucesso.

A eletroforese em gel de poliacrilamida, realizada neste trabalho, permitiu distinguir entre alelos de microssatélites, que não foi possível em eletroforese em gel de agarose. Para além disso, a eletroforese em gel de poliacrilamida permite maior sensibilidade na deteção de bandas e diferenciação de bandas menos evidentes, e pode ser uma alternativa mais económica e acessível a alguns laboratórios do que a análise de fragmentos automática.

Da análise feita para os microssatélites verificaram-se nove perfis alélicos para os nove loci para amostras de vermes. Identificaram-se doze perfis alélicos parciais (6 loci) para todas as amostras, sendo o perfil alélico parcial mais comum PAP- 2, em 5 amostras. Três perfis (PAP 2, 3 e 4) incluíram aproximadamente 50% das amostras e sete perfis foram encontrados em apenas uma amostra. Belanger et al. (2011) enfatizou a distribuição de alelos não ter estado apenas sob influência do número de grupos genéticos, como também

por sistema de amostragem. Tendo encontrado erros nos resultados em consequência de um gradiente genético, sugeriu uma análise de parentesco local anterior a análise genética da população (Belanger et al., 2011), que não foi possível realizar no âmbito deste trabalho.

Em relação as regiões geográficas estudadas, Santarém apresentou um maior número de perfis alélico, seguida de Coimbra. Na comparação feita entre os sexos em vermes adultos, quase todas as amostras apresentaram perfis diferentes. Belanger et al. (2011) não encontraram diferenças genéticas entre as amostras de dirofilariose em hospedeiros domésticos e selvagens ou entre vermes de diferentes sexos; mas apenas por região (Belanger et al., 2011). Contudo, usando informações geográficas para a avaliação da distribuição de genótipos, constatou-se também haver semelhança na identificação de quatro aglomerados populacionais das regiões orientais dos EUA.

Em resumo, neste estudo, não se encontrou diferenças substanciais entre os sexos dos vermes adultos, nem entre as duas regiões geográficas analisadas (Distritos de Santarém e Coimbra), que não apresentaram diferenças em número de alelos, nem nos perfis alélicos dominantes, mas apenas a nível perfis alélicos únicos. De notar que os dois distritos não apresentam barreiras geográficas entre si. O pequeno número de amostras estudadas não permitiu análises estatísticas nem análises populacionais de confiança. Contudo, a diversidade encontrada sugere que os microssatélites podem ser úteis para estudar um número maior de amostras em análises populacionais.

#### **4.1. Conclusões**

Para o estudo da diversidade genética e estrutura populacional do parasita *D. immitis* em Portugal foram comparados dois marcadores, um painel de 11 microssatélites e ITS2 ribossomal. As sequências de ITS2 permitiram uma análise filogenética mas não foram encontradas diferenças entre a maior parte das amostras estudadas neste trabalho e presentes na base de dados. Contudo, foi possível diferenciar alelos de microssatélites em eletroforese com gel de poliacrilamida, mesmo em amostras com a mesma sequência de ITS2.

Estes resultados indicam que um painel de seis a nove marcadores de microssatélites pode ser considerado informativo e uma alternativa mais apropriada para estudos populacionais

e de diversidade de *D. immitis* em Portugal, assim como provavelmente noutras regiões europeias.



## 5. Referências Bibliográficas

- Alho, A. M., Landum, M., Ferreira, C., Meireles, J., Gonçalves, L. A., Carvalho, L. M., Belo, S. 2014a. Prevalence and seasonal variations of canine dirofilariosis in Portugal. *Veterinary Parasitology*. 206: 99-105.
- Alho, A. M., Meireles, J., Belo, S., Carvalho, L. M de. 2014b. Dirofilariose canina e felina, uma parasitose em evolução (I) - Etiologia, Biologia e Epidemiologia. *Clínica Animal* 2: 20-25
- Anderson, R. C. 2000. Nematode parasites of vertebrates their development and transmission. 2nd edition. CABI publishing, United Kingdom, 483-486.
- Araújo, A. M. 1996. Canine and Human *Dirofilaria immitis* infection in Portugal. A review. VII European. Multicolloquim of Parasitology. Parma, Italy. 38 (1-2): 1-479.
- Ataie, A., Seyed, H. M. K., Hassan, V., Mohammad, R. Y. E., Hasan, B., Anjomruz, M. 2015. Assessing the Susceptibility Status of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a Dirofilariasis Focus, Northwestern Iran. *Journal of Arthropod Borne Diseases* 9 (1): 7-21.
- Balreira, A. C., Silvestre-Ferreira A. C., Fontes-Sousa, A. P., Vieira, L., Carretón, E., Montoya-Alonso, J. A. 2011. “Epidemiological survey of *Dirofilaria immitis* infection in dogs on the North and North Centre of Portugal preliminar results,” in International Workshop of Dirofilaria, Gran Canaria, 40-41.
- Belanger, D. H., Perkins, S. L., Rockwell, R. F. 2011. Inference of population structure and patterns of gene flow in canine heartworm (*Dirofilaria immitis*). *Journal of Parasitology*. 97 (4): 602-609.
- Belo, S., Afonso, A., Gonçalves, A. 2014. Dirofilariose humana em Portugal: Parasitose desconhecida ou negligenciada? *Acta Parasitológica Portuguesa*. 20 (1/2): 105-6.
- Borges, A., Rosa, M. S., Recchia, G. H., Silva, J. R. de Q., Bressan, E. de A., Veasey, E. A. 2009. CTAB methods for DNA extraction of sweet potato for microsatellite analysis. *Science Agriculture*. 66 (4): 529-534.
- Brito, A. C., Vila-Nova, M. C., Rocha, D. A. M., Costa, L. G., Almeida, A. P. de., Viana, L. da Silva., Lopes Jr, R. R., Fontes, G., Rocha, E. M. M. da., R, L. 2000. Prevalência da filariose causada por *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum* em Maceió, Alagoas, Brasil. 2000. 1497.

- Brown, H. E., Harrington, L. C., Kaufman, P. E., McKay, T., Bowman, D. D., Nelson, C. T., Wang, D., Lund, R. 2012. Key factors influencing canine heartworm, *Dirofilaria immitis*, in the United States. *Parasites & Vectors*. 5:245.
- Bowman, D. D., Liu, Y., McMahan, C. S., Nordone, S. K., Yabsley, M. J., Lund, R. B. 2016. Forecasting United States Heartworm *Dirofilaria immitis* Prevalence in dogs. *Parasites & Vectors*. 9: 540.
- Cambournac, F., Pitta, S. J. 1943. Sobre a frequência da infestação dos cães por *Dirofilaria immitis* Leidy em Águas de Moura. *Anais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical*. 1: 115-25.
- Cancrini, G., Gabrielli, S. 2007. Vectors of *Dirofilaria* nematodes: biology, behaviour and host/parasite relationships. In: *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections. Genchi C, Rinaldi L, Cringoli G, eds. Pp 47-58.
- Cardoso, L., Mendão, C., Carvalho, L. M. de. 2012. Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal a national serological study. *Parasites & Vectors*. 5: 62.
- Cruz, C. D. P. da. 2017. Prevalência da dirofilariose canina e humana no distrito do Porto. Tese de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Porto- Portugal.
- Ettinger, S., Feldman, E. 2004. Textbook of veterinary internal medicine. Volume 2. 6th ed. Saunders Elsevier. 1118-1144.
- Ferreira, C. A. C., Mixão, V de P., Novo, M. T. L. M., Calado, M. M. P., Gonçalves, L. A. P., Belo, S. M. D., Almeida, A. P. V de. 2015. First molecular identification of mosquito vectors of *Dirofilaria immitis* in Continental Portugal. *Parasites & Vectors*. 8: 139.
- Ferreira, P. P. C. 2012. *Lymnaea truncatula* em Portugal: Contribuição para o estudo da bioecologia e da variação genética. Tese de Doutoramento. Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa, Portugal.
- Ferreira, C., Afonso, A., Calado, M., Maurício, I., Alho, A. M., Meireles, J., Carvalho, L. M de and Belo, S. 2017. Molecular Characterization of *Dirofilaria* spp. Circulating in Portugal. *Parasites & Vectors*. 10: 250.
- Genchi, C. 2012. State of the art of dirofilarial infections in Europe. Third European *Dirofilaria* Days, Parma, Itália, 21-22 junho. (Poster).

- Gomes, B. A. J. 2009. Doenças parasitárias do cão transmitidas por insectos culicídeos e psicodídeos no Funchal e em Barcelona. Tese de mestrado em Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series. 41: 95-98.
- Hayasaki, M., Okajima, L., Song, K. H., Shiramizu, K. 2003. Diurnal variation in microfilaremia in a cat experimentally infected with larvae of *Dirofilaria immitis*. Veterinary Parasitology. 111 (2-3): 267-271.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. MEGA7. 2016: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution. 33: 1870-1874.
- Kramer, L. H., Tamarozzi, F., Morchón, R., López, J. B., Atxutegi, C. M., Pacho, M. R., Simón, F. 2005. Immune response to and tissue localization of the *Wolbachia* surface protein (WSP) in dogs with natural heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection. Veterinary Immunology and Immunopathology. 106 (3-4): 303-8.
- Mavropoulou, A., Gnudi, G., Grandi, G., Volta, A., Kramer, L. H., Quintavalla, C. 2014. Clinical assessment of post-adulticide complications in *Dirofilaria immitis*-naturally infected dogs treated with doxycycline and ivermectina. Veterinary Parasitology. 205 (1-2): 211-215.
- Megat Abd Rani, P. A., Irwin, P. J., Gatne, M., Coleman, G. T., McInnes, L. M., Traub, Rebeca J. 2010. Survey of canine filarial diseases of veterinary and public health significance in India. Parasites & Vectors. 3: 30.
- Meireles, J., Paulos, F., Serrão, I. 2014. Canine and feline dirofilariasis. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias. 109 (591-592): 70-78.
- Moraes, P. L. R. de, Derbyshire, M. V. de C. 2003. Diferenciação Genética e Diversidade em Populações Naturais de *Cryptocarya Aschersoniana* Mez (*Lauraceae*). Biota Neotropica. 3 (1).
- Mendonça, R. P de. 2007. Atividade endectocida de uma nova alternativa terapêutica (Scifenotrina, Butóxido de Piperonila, d-tetrametrina e ivermectina) em cães. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências Veterinárias e Agrárias, Universidade Estadual Paulista, Brasil.

- Morchón, R., Carretón, E., Miguel, J. G. Hernández, I. M. 2012. Heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) and their vectors in Europe: new distribution trends. *Frontiers in Physiology*. 3:196
- Oh, I. Y., Kin, K. T., Sung, H. J. 2017. Molecular Detection of *Dirofilaria immitis* Specific Gene from Infected Do Blood Sample Using *Polymerase Chain Reaction*. *Iranian Journal of Parasitology*. 12 (3): 433-440.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Brianti, E., Traversa, D., Petrić, D., Genchi, C., Capelli, G. 2013. Vector-Borne Helminths of Dogs and Humans in Europe. *Parasites & Vectors*. 6: 16.
- Pampiglione, S., Rivasi, F., Gustinelli, A. 2009. Dirofilarial human cases in the Old World, attributed to *Dirofilaria immitis*: a critical analysis. *Histopathology*. 54: 192–204.
- Razi Jalali, M. H., Mosallanejad, B., Avizeh, R. 2011. *Dirofilaria immitis* infection in a Dachshund dog: Diagnosis and Treatment. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*. 3 (1): 49-56.
- Rishniw, M., Barr, S. C., Simpson, K. W., Frongillo, M. F., Franz, M., Alpizar, J. L. D. 2006. Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Veterinary Parasitology*. 135: 303-314.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd. Cold Spring Harbor laboratory Press.
- Shearer, P. 2011. Literature Review- Heartworm Disease. (Banfield Applied Research & Knowledge Team). 1-16.
- Silva, R. C. da., Langoni, H. 2009. Dirofilariose. Zoonose emergente negligenciada. *Ciência Rural*. 39(5): 1614-1623.
- Simón, F., Siles-Lucas, M., Morchón, R., González-Miguel, J., Mellado, I., Carretón, E., Montoya-Alonso, J. A. 2012. Human and Animal Dirofilariasis: the Emergence of a Zoonotic Mosaic. *Clinical Microbiology Reviews*. 25(3): 507-544.
- Simón, F., Miguel, J. G., Diosdado, A., Gómez, P J., Morchón, R., Kartashev, V. 2017. The Complexity of Zoonotic Filariasis Ecosystem and Its Consequences: A Multidisciplinary View. *BioMed Research International*. 2017. 6436130.



- Teneva, A., Tomlekova, N., Goujgoulova, G. 2014. Major features, mutation mechanism and development of microsatellites as genetic markers. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 20: 949-956.
- Vieira, A. L., Vieira, M. J., Oliveira, J. M., Simões, A. R., Diez-Baños, P. D., Gestal, J. 2014. Prevalence of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs of central Portugal. 21: 5.
- Vieira, A. L. N. de M. P. 2016. *Dirofilariose Humana: Zoonose Negligenciada ou Desconhecida?* Tese de Mestrado em Medicina. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto.
- Wang, D., Carlson, S. R., Shi, J., William, R. 2003. A Low-Cost High-Throughput Polyacrylamide Gel Electrophoresis System for Genotyping with Microsatellite DNA Markers. *Crop Science*. 43: 1828-1832.